



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106069652 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610108786.8

(22)申请日 2016.02.26

(83)生物保藏信息

CGMCC No.9551 2014.07.18

(71)申请人 中国科学院西双版纳热带植物园

地址 666303 云南省西双版纳傣族自治州  
勐腊县勐仑镇

(72)发明人 高江云 邵士成 黄晖 刘强

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务  
所(普通合伙) 53108

代理人 谢嘉 旃习涵

(51)Int.Cl.

A01G 31/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种在茶树上直接播种齿瓣石斛种子培育  
种苗的方法

(57)摘要

本发明公开了一种在茶树上直接播种齿瓣  
石斛种子培育种苗的方法。将胶膜菌  
(*Tulasnella* sp.),制成真菌悬浮液,然后与野  
外采集的齿瓣石斛种子混匀制成种子-真菌悬浮  
液。用保鲜膜在茶树树干上缠绕1至3圈,将种子-  
真菌悬浮液均匀分散注入保鲜膜和树干之间的  
空隙位置,并在播种点附近扎孔。本发明简化了  
幼苗生产过程,明显降低生产成本,提高种苗量  
和幼苗回归到自然环境中后的存活率和幼苗生  
长速度,具有很好的环境适应性;当地居民在采  
集茶叶的同时可以收获石斛产品,起到增收的效  
果;不需要额外占用土地、建造栽培设施和化肥  
农药的使用,仅需要极低的制作种子-真菌悬浮  
液的成本投入,具有很高的推广应用价值。

1. 一种在茶树上直接播种齿瓣石斛种子培育种苗的方法,包括以下步骤:

(1)采集野外自然结实并成熟但果荚尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用;

(2)真菌悬浮液的制作:

2.1培养基的制作:以锥形瓶10%体积的量将PDA液体培养基装瓶,封口后装入灭菌锅,于121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用;

2.2将活化培养3~10天的胶膜菌(*Tulasnella* sp.),CGMCC No.9551接种于备用的PDA液体培养基,于23~28℃,120~200rpm条件下发酵培养5~10天;

2.3用纱布过滤发酵液获取菌丝体,用无菌水冲洗菌丝体3~5次并沥水以去除残留的葡萄糖,将菌丝体和1~20倍质量的无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液;

(3)种子-真菌悬浮液的制作:将齿瓣石斛种子与真菌悬浮液混匀制成种子-真菌悬浮液,控制种子-真菌悬浮液中有活力的齿瓣石斛种子密度为20~300个/ml;

(4)茶树林种子直播

4.1用普通保鲜膜在茶树树干上离地10cm以上的位置松散地缠绕1至3圈,用注射器取1~10ml的种子-真菌悬浮液均匀分散注入保鲜膜和树干之间的空隙位置;然后在种子-真菌悬浮液注射位置即每个播种点的附近用针刺破保鲜膜,使种子在萌发过程中和外界保持相通;

4.2播种30天时可见种子陆续发育成原球茎,45~50天时多数原球茎发育成幼苗,此时应在有幼苗处对保鲜膜开孔放苗。

2.根据权利要求1所述的育苗方法,其特征在于:步骤2.2中,发酵培养条件优选为28℃,150rpm,7天。

3.根据权利要求1所述的育苗方法,其特征在于:步骤2.3中,制作真菌悬浮液所用无菌水的质量优选为菌丝体的10倍。

4.根据权利要求1所述的育苗方法,其特征在于:步骤4.1中,所述的保鲜膜缠绕位置优选离地10~15cm高,缠绕2圈;每个播种点扎孔2~6个,孔间距为1cm。

5.根据权利要求1所述的育苗方法,其特征在于:步骤4.2中,所述的开孔放苗其孔径优选为0.25~4cm<sup>2</sup>。

## 一种在茶树上直接播种齿瓣石斛种子培育种苗的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于石斛栽培技术领域,具体是涉及一种基于共生萌发技术的齿瓣石斛种子直接播种于茶树树干上以获得齿瓣石斛幼苗的方法。

### 背景技术

[0002] 齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum*)茎条含有较高的多糖成分,作为传统中药材有着极高的药用价值,在云南很多地区广为栽培,特别是在龙陵县已成为其支柱产业。现有的栽培模式主要为集约化种植,多采用“公司+基地+农户”的形式,用组培苗作为种苗,由于需要建造温棚、喷灌系统以及占地租金等使得种植成本居高不下;同时,在石斛苗生长过程中,为促进石斛幼苗快速生长需使用大量的化肥农药,造成产品农残、重金属含量超标等,产品质量不高。

[0003] 模拟石斛植物在自然环境下的生长条件来发展石斛栽培产业是解决上述问题的有效途径之一。在自然条件下,石斛属植物种子的萌发需要完全依靠某种特定的共生真菌来获取营养物质。如果利用能够促进种子有效萌发的真菌实施共生萌发技术,同时选择合适的生境,例如有自然分布的特定种类石斛的人工林进行培育,并结合适当管理,应该能够实现现在野外建立种群达到石斛生态栽培的目的。但现有技术中关于齿瓣石斛的野外生态育苗技术尚不成熟。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种在茶树上直接播种齿瓣石斛种子培育种苗的方法,以简化育苗过程、降低成本、提高种苗产量。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案予以实现。

[0006] 除非另有说明,本发明所采用的百分数均为质量百分数。

[0007] 一种在茶树上直接播种齿瓣石斛种子培育种苗的方法,包括以下步骤:

[0008] (1)采集野外自然结实并成熟但果荚尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用;

[0009] (2)真菌悬浮液的制作:

[0010] 2.1培养基的制作:以锥形瓶10%体积的量将PDA液体培养基装瓶,封口后装入灭菌锅,于121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用;

[0011] 2.2将活化培养3~10天的胶膜菌(*Tulasnella* sp.),CGMCC No.9551接种于备用的PDA液体培养基,于23~28℃,120~200rpm条件下发酵培养5~10天;

[0012] 2.3用纱布过滤发酵液获取菌丝体,用无菌水冲洗菌丝体3~5次并沥水以去除残留的葡萄糖,将菌丝体和1~20倍质量的无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液;

[0013] (3)种子-真菌悬浮液的制作:将齿瓣石斛种子与真菌悬浮液混匀制成种子-真菌悬浮液,控制种子-真菌悬浮液中有活力的齿瓣石斛种子密度为20~300个/ml;

[0014] (4)茶树林种子直播

[0015] 4.1用普通保鲜膜在茶树树干上离地10cm以上的位置松散地缠绕1至3圈,用注射

器取1~10ml的种子-真菌悬浮液均匀分散注入保鲜膜和树干之间的空隙位置;然后在种子-真菌悬浮液注射位置即每个播种点的附近用针刺破保鲜膜,使种子在萌发过程中和外界保持相通;

[0016] 4.2播种30天时可见种子陆续发育成原球茎,45~50天时多数原球茎发育成幼苗,此时应在有幼苗处对保鲜膜开孔放苗。

[0017] 步骤2.2中,发酵培养条件优选为28℃,150rpm,7天。

[0018] 步骤2.3中,制作真菌悬浮液所用无菌水的质量优选为菌丝体的10倍。

[0019] 步骤4.1中,所述的保鲜膜缠绕位置优选离地10~15cm高,缠绕2圈;每个播种点扎孔2~6个,孔间距为1cm。

[0020] 步骤4.2中,所述的开孔放苗其孔径优选为0.25~4cm<sup>2</sup>。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0022] 本发明在自然或半自然条件下,基于共生萌发技术开展药用石斛种子直播栽培,相对于人工集约化栽培,省去了昂贵的棚架、苗床、喷灌系统等基础设施的投入和昂贵的日常管理成本,从而可以满足贫困地区当地居民由于经济条件的限制无法承受的高成本和投入。更重要的是,这种仿生态栽培的产品具有成本低、品质高、无农药残留等特点,市场营销的潜力大。西双版纳具有得天独厚的气候优势,大量存在的古茶园仍保持着乔木和茶树混植的模式,这样的小生境极为适合包括石斛在内的很多兰科植物生长。茶树上本身就有大量不同种类的野生石斛生长,在这样半人工管理的古茶园,实施石斛种子共生萌发直播栽培,对茶叶生产毫不影响,又能大大提高经济效益。齿瓣石斛仿生态栽培,只需要进行粗放管理,降低栽培管理难度和投入,在增加居民收入的同时,减少对野生资源的采集强度,以达到资源保护和持续利用的目的,这应是石斛产业长期可持续发展的新途径。

[0023] 本发明能简化幼苗生产过程,明显降低生产成本,提高种苗量和幼苗回归到自然环境中后的存活率和幼苗生长速度,具有很好的环境适应性;其次,当地居民在采集茶叶的同时可以收获石斛产品,起到增收的效果;再次,本发明播种方法不需要额外占用土地、建造栽培设施和化肥农药的使用,仅需要极低的制作种子-真菌悬浮液的成本投入,故直播技术成本很低,具有很高的推广价值。

[0024] 保藏生物材料的说明

[0025] 本发明的菌株,已于2014年07月18日,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMC);该中心地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。该菌株分类命名为胶膜菌(*Tulasnella* sp.),保藏号为CGMCC No.9551。

## 具体实施方式

[0026] 以下通过实施例对本发明作进一步的详细说明,但实施例并不是对本发明技术方案的限定。

[0027] 实施例1:

[0028] 1、齿瓣种质的获得与保存

[0029] 采集野外自然结实并成熟但尚未开裂的齿瓣石斛种子保存备用。所用的齿瓣石斛种子采自云南省保山市龙陵县的野外种群。

[0030] 2、真菌的悬浮液的制作

[0031] 2.1培养基的制作:PDA液体培养基常规做法,适量。以每瓶50ml平均分装入70瓶500ml三角瓶,封口后用报纸包裹瓶口,装入灭菌锅于121℃,115KPa条件下灭菌20min,备用。

[0032] 2.2将活化培养7天的菌株-胶膜菌(*Tulasnella* sp.)CGMCC No.9551,接种于上述灭菌的含50ml液体培养基的三角瓶,于28℃,150rpm培养条件下发酵培养7天。

[0033] 2.3用纱布过滤培养好的发酵液获取菌丝体并用无菌水冲洗菌丝体4次,每次沥水以去除残留的葡萄糖。按质量比为1:10的沥水菌丝体和无菌水放入匀浆机打碎制成真菌悬浮液。

[0034] 3、种子-真菌悬浮液的制作

[0035] 3.1按常规TTC方法检测备用的齿瓣石斛种子活力,以确认种子活力有无及有活力种子的比例,根据有活力种子的比例确认种子用量。本实施例中具活力种子比率为79.6%。

[0036] 3.2将一个齿瓣石斛果荚内约30%的种子加入真菌悬浮液混匀制成种子-悬浮液。取200 $\mu$ l悬浮液6次徒手制片在显微镜下检测种子数,计算每毫升所含种子数量即得悬浮液种子密度。本实施方案种子密度分别为194个/ml,种子-真菌悬浮液共计204ml。

[0037] 按照一个齿瓣石斛果荚种子数的10%至100%加入1L真菌悬浮液,即种子-真菌悬浮液中种子密度约20-300个/ml为宜,过少会影响种苗量,过多则种子萌发后空间狭小。

[0038] 4、野外茶树树干种子直播

[0039] 4.12014年6月11日在云南省景洪市基诺乡亚诺村龙帕古茶园作为试验点进行播种。用普通保鲜膜在茶树树干上离地10~15cm高的位置松散的缠绕2圈,用注射器取4毫升种子-真菌悬浮液均匀分散注射入保鲜膜和树干之间的空隙位置。

[0040] 4.2待种子直播完后,用钢针在播种点扎孔以保持种子萌发过程中和外界相通,使种子更接近于自然萌发状态。

[0041] 4.3播种30天时可见种子陆续发育成原球茎,45-50天时多数原球茎发育成幼苗,此时对保鲜膜开孔放苗,以防止高温灼伤幼苗并提供幼苗足够的生长空间,孔径大小依据幼苗数量多少而定,一般每棵苗1cm<sup>2</sup>为宜。

[0042] 5数据分析

[0043] 播种30天时野外保鲜膜下可见种子陆续发育成绿色原球茎(大小如小米粒),45-50天时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择51个播种点,其中18个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率35.29%;共获得幼苗79棵,平均每个点获得幼苗1.55棵。

[0044] 实施例2:

[0045] 重复实施例1,有以下不同点:

[0046] 2014年6月17日在云南省景洪市基诺乡亚诺村龙帕古茶园作为试验点进行播种。种子-真菌悬浮液种子密度为118个/ml,共计136ml。

[0047] 播种45-50d时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择34个播种点,其中18个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率52.94%;共获得幼苗128棵,平均每个点获得幼苗3.76棵。

[0048] 实施例3:

[0049] 重复实施例1,有以下不同点:

[0050] 2014年7月5日在云南省勐腊县易武乡易比古茶园作为试验点进行播种。种子-真

菌悬浮液种子密度为88个/ml,共计180ml。

[0051] 播种45-50d时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择45个播种点,其中10个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率22.22%;共获得幼苗49棵,平均每个点获得幼苗1.09棵。

[0052] 实施例4:

[0053] 重复实施例1,有以下不同点:

[0054] 2014年7月25日在云南省景洪市基诺乡亚诺村龙帕古茶园作为试验点进行播种。种子-真菌悬浮液种子密度为242个/ml,共计200ml。同时,播种琼脂-种子悬浮液作为对照实验,种子密度为320个/ml,共计100ml。其余培养条件一致。

[0055] 播种45-50d时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择50个播种点,其中18个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率36.00%;共获得幼苗42棵,平均每个点获得幼苗0.84棵。对照试验没有种子萌发形成幼苗。

[0056] 实施例5:

[0057] 重复实施例1,有以下不同点:

[0058] 2014年8月27日在云南省勐腊县易武乡易比古茶园作为试验点进行播种。种子-真菌悬浮液种子密度为206个/ml,共计432ml。

[0059] 播种45-50d时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择108个播种点,其中47个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率43.52%;共获得幼苗128棵,平均每个点获得幼苗1.19棵。

[0060] 实施例6:

[0061] 重复实施例1,有以下不同点:

[0062] 2014年9月4日在云南省勐腊县易武乡易比古茶园作为试验点进行播种。种子-真菌悬浮液种子密度为104个/ml,共计380ml。同时,播种琼脂-种子悬浮液作为对照实验,种子密度为203个/ml,共计100ml。其余培养条件一致。

[0063] 播种45-50d时多数原球茎发育成幼苗。本次播种共选择95个播种点,其中29个点有种子萌发形成幼苗,群体萌发率30.53%;共获得幼苗51棵,平均每个点获得幼苗0.54棵。对照试验没有种子萌发形成幼苗。

[0064] 从以上实施例可知,分别于不同时间在两个地点共播种6批次,其每批次播种点数、平均每个点的幼苗数和群体萌发率详见表1。利用直播技术共播种6批次383点,平均种群萌发率为36.75%,共获得477棵幼苗,平均每个播种点获得1.25棵幼苗。基于共生萌发技术的齿瓣石斛种子茶树树干直播技术取得初步成功。

[0065] 表1不同播种时间和地点种子萌发情况比较

[0066] Table 1 The comparison on seedling number and population germination rates between different sowing time in two sites

[0067]

播种日期	播种地点	播种次数	平均幼苗数量 (棵/播种点)	种群萌发率(%)
2014-6-11	龙帕古茶园	51	1.55	35.29
2014-6-17	龙帕古茶园	34	3.76	52.94
2014-7-05	易比古茶园	45	1.09	22.22
2014-7-25	龙帕古茶园	50	0.84	36.00
2014-8-27	易比古茶园	108	1.19	43.52
2014-9-4	易比古茶园	95	0.54	30.53

[0068]

对照试验				
2014-7-25	龙帕古茶园	25	0	0
2014-9-4	易比古茶园	25	0	0

[0069] 齿瓣石斛种子-真菌悬浮液野外茶树树干直接播种获得大量幼苗,成功的建立了新种群,加之适当人工管理可以辅助新建种群复壮进而形成一种新的石斛栽培模式,实现产业化种植。本发明所涉及的齿瓣石斛直播种植模式相比集约化种植具有明显优势:成本低,不需要建立苗圃、灌溉设施和土地租金,且管理粗放;易推广,成本低使得多数茶农可以接受这种种植模式;生态友好,不与茶树形成竞争关系,不影响茶叶品质;产品质量高,虽然远不及苗圃幼苗生长速度快,但其品质相当于野生种群,故有较大的价格优势。利用人工的办法在野外建立大量种群可以实现齿瓣石斛资源的可持续利用,是值得推广的新栽培模式。